铜绿假单胞菌Ⅵ型分泌系统的研究进展

方雪瑶 胡龙华 杭亚平 俞凤 陈艳慧 钟桥石*

(南昌大学第二附属医院检验科，江西省检验医学重点实验室，南昌 330006)

摘要：铜绿假单胞菌是一种能引起多部位急慢性感染且难以用抗生素控制的机会致病菌，近年来已成为院内感染的主要致病菌之一。大量研究表明，细菌将毒力因子精准输送至宿主细胞是其致病的关键，分泌系统在这一过程中扮演重要作用，其中近期发现的Ⅵ型分泌系统(Type VI secretion system,T6SS)在铜绿假单胞菌与宿主间的相互作用和促进生物膜的形成等机制中发挥重要作用，已引起国内外学者高度关注。着重对铜绿假单胞菌 T6SS 的结构组成、效应功能和调节机制等相关研究进行简要综述，旨在为铜绿假单胞菌感染患者的治疗提供新策略。

关键词：铜绿假单胞菌；Ⅵ型分泌系统；效应蛋白

Research progress of Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*

Fang Xue-yao,Hu Long-hua,Hang Ya-ping,Yu Feng,Chen Yan-hui, Zhong Qiao-shi

(Department of Clinical Laboratory Medicine,the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Key Laboratory of laboratory medicine in Jiangxi Province,Nanchang 330006,China)

Abstract In recent years, *Pseudomonas aeruginosa* has become one of the main pathogens of nosocomial infections, which is an opportunistic pathogen can cause acute or chronic multiple infections and is hard to be controlled by antibiotics. Studies have shown that the key to pathogenicity is the precise delivery of virulence factors to host cells by bacteria, while the secretory system plays an important role in this process. Among them, the recently discovered Type VI secretion system (T6SS) is a type of secretion system that has drawn great attention from domestic and foreign ,which plays an important role not only in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and the host but also in the mechanism of promoting biofilm formation. Focusing on the studies of the structure, functions and regulatory mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* T6SS, a brief review was conducted to provide a new strategy for the treatment of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection.

Key words:*Pseudomonas aeruginosa*; Type VI secretion system;effectors

前言

铜绿假单胞菌为临床常见条件致病菌，能产生多种毒力因子，引起皮肤、呼吸道、消化道、泌尿道等多部位的急、慢性感染。铜绿假单胞菌对多种抗菌药物天然耐药，临床治疗面临严峻挑战。研究表明，铜绿假单胞菌致病的主要机制与其编码的 5 型（包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型）分泌系统密切相关[1]。其中，Ⅵ型分泌系统(Type VI secretion system,T6SS)是最近发现的分泌系统，除能产生毒力蛋白外，还能促进铜绿假单胞菌生物被膜的形成，对铜绿假单胞菌的致病性及耐药性发挥重要作用。因此，了解 T6SS 的效应

基金项目：江西省青年自然基金项目（NO.20171BAB2150798）；江西省教育厅一般项目（NO.GJJ160172）

*通信作者。E-mail：zhong20000947@sina.com

功能及其调节机制，将有助于铜绿假单胞菌所致感染的控制。本文就 T6SS 的发现、结构、效应功能及调控机制等方面的最新研究进展综述如下。

1 铜绿假单胞菌中 T6SS 的发现及命名

2006 年，Mougous 等[2]发现铜绿假单胞菌中存在一种效应蛋白分泌系统，且该分泌系统在与宿主的致病过程中发挥着重要作用，将其命名为Ⅵ型分泌系统。早在 2003 年 Badergroen 等[3]在研究根瘤菌时发现了一个固氮作用受损的基因簇，命名为 IAHP（IcmF-associated homologous protein）簇；该基因簇与编码Ⅳ型分泌系统(T4SS)的组分(IcmF 样蛋白)同源。 2006 年 Pukatzki 等[4]对霍乱弧菌感染的研究中也发现，霍乱弧菌的效应蛋白溶血素共调节蛋白(Hemolysin coregulated protein, Hcp)和缬-甘氨酸重复蛋白 G(Valine-glycine repeat protein G, VgrG)的分泌，需要 IAHP 簇的参与才能发挥对 *Dictyostelium amoebae* 的细胞毒性，表明霍乱弧菌与铜绿假单胞菌中 IAHP 基因簇可编码一种新型分泌系统，并正式命名为 T6SS。

2 T6SS 的结构、装配及分泌作用

T6SS 是一种在结构上和功能上相对保守的复杂大分子装置，形成一种倒置镶嵌在细菌细胞膜上的噬菌体样结构，并通过该装置直接将效应蛋白注入宿主细胞内发挥生物学效应。

2.1 T6SS 的结构

大量研究发现，不同物种间的 T6SS 基因簇组成成分略有差异，但其中 13 个保守基因（TssA—TssM）是 T6SS 发挥正常功能所必须的[5]，所以各种病原菌的 T6SS 在电子显微镜下具有相似结构。根据功能的不同，将铜绿假单胞菌编码 T6SS 蛋白的基因簇大致可分为 3 类；第一类为编码跨膜相关蛋白：TssL，TssM 及脂蛋白 TssJ 等，这些蛋白相互作用形成膜-锚定复合体以横跨整个细胞膜[6]，是整个分泌装置装配的起点，发挥固定基板、建立跨膜通道的作用[7, 8]；第二类为编码类噬菌体尾部结构相关蛋白，根据功能不同又可将其大致分为 3 组：（1）噬菌体注射器样结构　主要由 Hcp 和 VgrG 组成[9]；其中 Hcp 类似于 T4 噬菌体的尾管蛋白 gp19，可形成内径为 4 nm 的六聚体管状结构蛋白，是效应蛋白的转运通道；VgrG 类似于 T4 噬菌体的 gp5/gp27 尾钉蛋白，位于 Hcp 管道末端，经 Hcp 管道将效应蛋白注入靶细胞内。此外，Hcp-VgrG 结构的末端还有一个圆锥形的针头蛋白脯氨酸-丙氨酸-丙氨酸-精氨酸重复蛋白（Proline Alanine Alanine Arginine，PAAR），使“注射器”结构更加尖锐、稳定[10, 11]。（2）噬菌体尾鞘样结构：主要成分为 TssB/TssC 二聚体，该二聚体与噬菌体蛋白 gp18 高度相似，其形成的管状结构蛋白包绕在 Hcp 外侧，通过收缩方式将“注射器样结构”喷射至靶细胞表面，从而刺穿靶细胞的细胞膜，同时将效应蛋白注入胞浆内[12-14]。（3）噬菌体基板样结构：主要包括 TssA、TssE（也被称为 HsiF）、TssF、TssG 和 TssK 等，位于细胞质内，形成与噬菌体 gp25 类似的基板样结构[6, 15]。第三类为编码装置中能量供应的蛋白：目前已知的主要为 ClpV，ClpV 通过水解 ATP 驱动 TssB/TssC 的重构，使 TssB/TssC 的构象在收缩-舒张-收缩的循环状态[16, 17]。此外，研究证实 ClpV 还具有水解细胞内异常的鞘管作用，以确保 T6SS 分泌作用[18]。

2.2 T6SS 的装配

目前的研究普遍认为 T6SS 的噬菌体样注射装置是病原菌在某些外界因子刺激下而暂时形成的，因此 T6SS 的装配显得非常重要。然而，该结构的详细装配机制尚无定论。有

研究认为，T6SS 注射装置可能是在某些因素（低浓度铁、QS、竞争菌攻击等）刺激下被激活，首先 TssL，TssM 及脂蛋白 TssJ 形成跨膜结构，随后 TssA，TssE，TssF，TssG 和 TssK 等蛋白形成基座部分，VgrG、PAAR 及效应蛋白被招募到基座复合物上，从而稳定了整个复合物；Hcp 蛋白以 VgrG 三聚体为聚合起点形成跨膜的六聚体孔道，最后 TssB/TssC 也随着 Hcp 管状物的延伸而聚合到其外围，从而完成整个装配过程[19]。在整个过程中主要由 ClpV 水解 ATP 为系统的组装提供能量。（详见图 1）

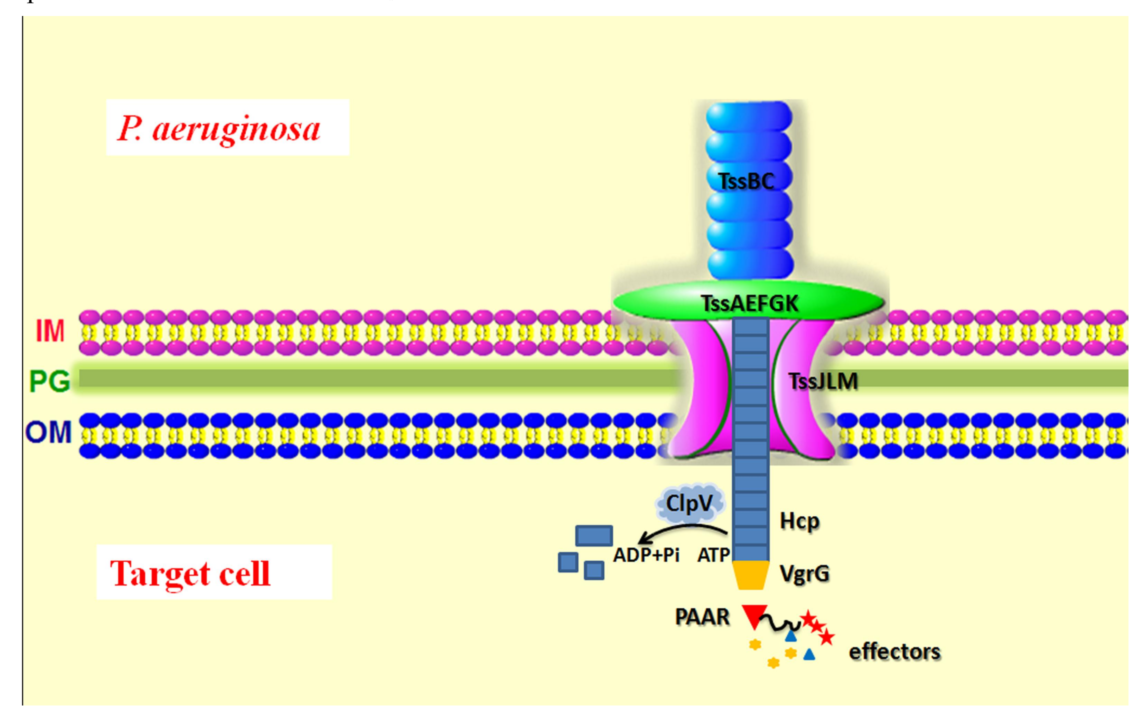


图 1 T6SS 的结构及装配示意图（改编自参考文献[19]）

Fig.1 Schematic Representation of the Structure and Mechanism of the Type VI Secretion System（adapted from reference[19]）

注：IM 为内膜；OM 为外膜；PG 为肽聚糖

2.3 T6SS 的分泌作用

T6SS 中部分蛋白(Hcp，VgrG，TssE 等)的构造和折叠与 T4 噬菌体的核心结构(gp 蛋白)高度相似，提示 T6SS 具有与噬菌体注射遗传物质方式类似的效应蛋白分泌过程。铜绿假单胞菌中 T6SS 的分泌首先在其他结构蛋白的辅助下，噬菌体样尾鞘结构收缩引起 Hcp 管向细胞外延伸，使 VgrG-PAAR “针头”样结构注射入宿主细胞内，所携带的效应蛋白则利用 ClpV 水解 ATP 时释放的能量穿过 Hcp 孔道进入宿主细胞，或在外膜脂蛋白的协助下进入外界环境中；当一整轮分泌过程完成后，ClpV 蛋白将部分外鞘和 Hcp 管状物解聚，剩余未被注射的 Hcp 管状物及基底复合物则在下一轮注射过程中被持续利用[19]。

3 铜绿假单胞菌 T6SS 的效应蛋白

Bingle 等人[20]发现铜绿假单胞菌中存在 3 种进化上完全不同的 T6SS 基因群（分别为 H1-T6SS、H2-T6SS 和 H3-T6SS），导致它们效应功能上具有一定差异性，如 H1-T6SS 能够抑制同一环境中竞争菌的生长（仅作用于原核细胞），而 H2、H3-T6SS 在原核细胞及真核细胞的致病过程中均有重要作用。效应蛋白在铜绿假单胞菌的 T6SS 中起到关键作用，因此各型 T6SS 所分泌的效应蛋白的组成、功能成为研究热点。

3.1 铜绿假单胞菌 H1-T6SS 的效应蛋白

2010年Hood等[21]首次发现铜绿假单胞菌的毒力基因H1-T6SS能编码产生3种效应蛋白（Tse1、Tse2和Tse3），通过直接注入同一宿主其他细菌的胞浆内发挥溶菌效应，使铜绿假单胞菌得以优势生长。Tse1和Tse3能够分别降解细菌肽聚糖结构中的肽侧链和糖主链部分，最终导致细菌降解；而Tse2是一种能够有效抑制竞争菌体中DNA增殖的胞质内效应器，引起竞争菌繁殖状态受限，同一环境中的铜绿假单胞菌成为优势菌群[22, 23]。有趣的是，铜绿假单胞菌为了避免被自身分泌的Tse效应蛋白所杀伤，其菌体还能产生3种对应的免疫蛋白（Tsi1、Tsi2和Tsi3）作为自我防御机制，如Tsi1与Tse1在胞内相互反应，在晶体结构上阻碍Tse1酶活性位点，导致其失活[23]。在对H1-T6SS的进一步研究中又发现了4种效应蛋白（Tse4—Tse7），这些蛋白在抑制竞争菌效应中也发挥重要作用[24-26]。综上所述，H1-T6SS具有强大的抗竞争菌作用，能使铜绿假单胞菌在多种细菌混合生长环境中呈明显优势生长。

3.2 铜绿假单胞菌 H2-T6SS、H3-T6SS 的效应蛋白

磷脂酶是一种广泛存在于真核、原核生物体内的，具有水解甘油磷脂的功能的一类酶，是病原体致病的主要毒力因素之一。Russell 等[27]研究发现，磷脂酶能够在细菌 T6SS 中介导抗菌活性，因此将这类蛋白超家族命名为 VI 脂肪酶效应器（Type VI lipase effectors ,Tle），并归为 5 类（Tle1-Tle5）；其中磷脂酶 A（phospholipase A,PldA）是铜绿假单胞菌 H2-T6SS 的效应蛋白，也属于 Tle 超家族[28]。Jiang 等[29]在进一步研究中发现，H2-T6SS 分泌的 PldA 是一种即能转位到原核细胞内，又能跨界转位到真核细胞的效应蛋白，揭示了 PldA 在真核、原核细胞中均发挥毒性作用。PldA 在原核生物中主要通过降解磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine ,PE），破坏细菌细胞膜，发挥拮抗其他细菌的作用[27]；一旦 H2-T6SS 将 PldA 作为效应蛋白“注射”入真核细胞内，可激活 PI3K-Akt 信号通路，使铜绿假单胞菌能够轻易侵入到上皮细胞内，最终引起皮肤、肺等组织器官感染[29]。除 PldA 外，VgrG2b 也被证实是铜绿假单胞菌 H2-T6SS 的效应蛋白；铜绿假单胞菌 H2-T6SS 中 VgrG 可分为 2 个亚组，分别为 VgrG2a 和 VgrG2b，其中 VgrG2a 作为 H2-T6SS 注射器样结构的组成成分，VgrG2b 则通过与宿主细胞的γ-微管蛋白复合体相互作用，促进铜绿假单胞菌对真核细胞的入侵，从而发挥效应作用[30]。

国内外对铜绿假单胞菌 T6SS 研究的热点主要集中于 H1-T6SS、H2-T6SS，而对 H3-T6SS 的效应蛋白及功能相关研究相对较少，现研究发现其分泌的效应蛋白仅磷脂酶 B（phospholipase B,PldB）一种。PldB 与 PldA 的效应功能相同，通过激活 PI3K-Akt 信号通路促使铜绿假单胞菌感染真核细胞，然而对原核细胞产生毒性的作用机制尚无研究报道[29]。值得一提的是，铜绿假单胞菌在产生 H2-T6SS 和 H3-T6SS 效应蛋白的同时，也会分泌具有中和效应蛋白作用的同源性免疫蛋白，防止菌体自身受到攻击[20, 31]。

4 铜绿假单胞菌 T6SS 的调控

4.1 QS 对 T6SS 的调控

群体感应系统（quorum sensing systems, QS）是一种能够实现细菌对宿主环境适应能力增强的细菌间通讯系统，铜绿假单胞菌QS至少包括三种子系统，即AHL信号依赖的*las*系统、*rhl*系统和AQ信号依赖系统（PQS系统，又称喹诺酮信号系统）[32]。在QS子系统的共同参与调控下，铜绿假单胞菌的毒力因子（如碱性蛋白酶、外毒素A、弹性蛋白酶等）及次级代谢产物（鼠李糖脂溶血素、绿脓菌素）的释放和菌体生活方式等发生适应

性改变。已有研究表明 QS 能够调控铜绿假单胞菌 T6SS 基因的表达，但对不同种 T6SS 基因簇的调控存在差异。B. Lesic 等[33]研究发现， H1-T6SS 的基因表达受 PQS 系统转录活化因子 MvfR 和 *las* 系统转录活化因子 LasR 的负向调控；而 H2-T6SS 和 H3-T6SS 的基因表达则受 *las/rhl* 系统和 MvfR 的正向调控[34]。

4.2 Fur 对 T6SS 的调控

铁是细菌生长所必需的微量元素。细菌通过铁吸收调节蛋白(ferric uptake regulator, Fur)调控菌体内铁离子代谢的平衡，因此 Fur 对细菌生长和防止铁毒性起重要作用。研究发现，Fur 除具有调节细菌的铁离子代谢的功能外，还参与多种毒力基因的表达，其中铜绿假单胞菌 H2-T6SS 启动子区域存在 2 个 Fur 基因盒；当铁缺乏或利用受抑制时，H2-T6SS 基因可受到 Fur 的调控并表达，最终增强铜绿假单胞菌对宿主细胞的致病性[35]。

4.3 RpoN 对 T6SS 的调控

细菌的氮代谢调控因子（RpoN 或σ-54 因子）是一类可选择性识别启动子序列的σ因子，主要参与氮代谢、鞭毛和菌毛的生物合成等环境适应过程，同时与病原菌的致病性密切相关[36]；有研究表明，RpoN 能够通过间接调控 QS 系统使铜绿假单胞菌耐药性、毒力因子表达发生改变[37, 38]。Sana 等[35]研究发现，RpoN 在 T6SS 基因簇的转录过程中具有调控作用，其中 RpoN 能够负向调控 H2-T6SS 和部分 H3-T6SS 的表达，而对另一部分 H3-T6SS 的表达起上调作用；此后 Cai Z 等[39]证实 RpoN 的靶位点包含编码 QS 的调控子和 T6SS 的结构蛋白（*hcpA 和 hcpB*）等的代谢基因，进一步表明 RpoN 对 T6SS 的调控具有重要意义。

4.4 RsmA 对 T6SS 的调控

二元调控系统是一种可通过对环境刺激作出适应性反应的跨膜信号转导机制；其中 Rets 和 Lads 为存在于铜绿假单胞菌中的杂交感受器激酶，二者均可经 GacSA-RsmY/Z-RsmA 级联通路对铜绿假单胞菌的鞭毛运动和生物膜形成等产生调控[40, 41]。在这一调控过程中， Lads 引起通路的关键调控因子——游离态 RsmA 浓度减低；Rets 则发挥截然相反的调控作用。有研究证实，RsmA 对铜绿假单胞菌的 T6SS 分泌及生物膜的形成中具有负向调控作用，而在 T3SS 的分泌及鞭毛运动中发挥正向调控作用，与铜绿假单胞菌引起宿主的急、慢性感染具有密切联系[42, 43]。因此，Rets 和 Lads 能够分别通过对 RsmA 的间接调控，进而影响铜绿假单胞菌 T6SS 的分泌。

5 铜绿假单胞菌 T6SS 的主要生物学功能

铜绿假单胞菌的 T6SS 在受到不同水平的调控后，通过装配形成的噬菌体样结构将效应蛋白“注射”入靶细胞内而发挥各类生物学作用[44]。目前研究公认的至少有 2 种主要的生物学功能：一种为在细菌微环境中发挥竞争性作用，使铜绿假单胞菌在宿主体内能够优势生长；另一种为通过水解细胞膜脂质成分，使铜绿假单胞菌对宿主的感染能力增强[21, 35]；此外，研究还表明铜绿假单胞菌的 T6SS 效应蛋白的作用与宿主的生存期呈负相关，并且具有 T6SS 分泌能力的铜绿假单胞菌能够促进生物膜的形成和绿脓素等次级代谢产物的产生[45]，进一步提示 T6SS 在铜绿假单胞菌的致病力中具有重要作用。

6 T6SS 的治疗策略

由于 T6SS 在铜绿假单胞菌对宿主的感染、致病及生存等各环节均发挥重要作用，因此针对其致病机制的研究具有重大意义。现阶段，国内、外针对 T6SS 介导的铜绿假单胞菌感染暂无有效的治疗方案。最新研究显示，纳米体 nb25 能通过与 T6SS 膜-锚定复合体中

的脂蛋白 TssJ 竞争性结合 TssM 位点，使 T6SS 分泌装置的装配受到限制，导致 T6SS 无法发挥有效作用[46]。因此对 T6SS 抑制剂的研究，将为治疗由 T6SS 介导的铜绿假单胞菌感染性疾病提供新思路。

7 小结与展望

铜绿假单胞菌能够产生多种蛋白分泌系统，并在抗菌药物治疗过程中极易变异而形成多重耐药菌，控制铜绿假单胞菌所致感染已成为一个难点。本文回顾了铜绿假单胞菌T6SS的起源、装配、调控和效应作用等，证实 T6SS参与了铜绿假单胞菌感染宿主、致病及生物膜形成等过程中发挥关键作用。因此，T6SS可作为治疗铜绿假单胞菌感染性疾病的新靶标。近年来对T6SS抑制剂的研究逐渐增多，有望发展有效药物控制T6SS介导的铜绿假单胞菌感染性疾病。

参考文献:

[1] Golovkine G, Reboud E, Huber P. *Pseudomonas aeruginosa* Takes a Multi-Target Approach to Achieve Junction Breach[J]. Front Cell Infect Microbiol,2017,7:532.
[2] Mougous J D, Cuff M E, Raunser S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus[J]. Science,2006,312(5779):1526-1530.
[3] Bladergroen M R, Badelt K, Spaink H P. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion[J]. Mol Plant Microbe Interact,2003,16(1):53-64.
[4] Pukatzki S, Ma A T, Sturtevant D, et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2006,103(5):1528-1533.
[5] Boyer F, Fichant G, Berthod J, et al. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources?[J]. BMC GENOMICS,2009,10(104).
[6] Brunet Y R, Zoued A, Boyer F, et al. The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization[J]. PLoS Genet,2015,11(10):e1005545.
[7] Logger L, Aschtgen M S, Guerin M, et al. Molecular Dissection of the Interface between the Type VI Secretion TssM Cytoplasmic Domain and the TssG Baseplate Component[J]. J Mol Biol,2016,428(22):4424-4437.
[8] Zoued A, Duneau J P, Durand E, et al. Tryptophan-mediated Dimerization of the TssL Transmembrane Anchor Is Required for Type VI Secretion System Activity[J]. J Mol Biol,2018,430(7):987-1003.
[9] Brunet Y R, Henin J, Celia H, et al. Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway[J]. EMBO Rep,2014,15(3):315-321.
[10] Shneider M M, Buth S A, Ho B T, et al. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike[J]. Nature,2013,500(7462):350-353.
[11] Cianfanelli F R, Alcoforado D J, Guo M, et al. VgrG and PAAR Proteins Define Distinct Versions of a Functional Type VI Secretion System[J]. PLoS Pathog,2016,12(6):e1005735.
[12] Ge P, Scholl D, Leiman P G, et al. Atomic structures of a bactericidal contractile nanotube in its pre- and postcontraction states[J]. Nat Struct Mol Biol,2015,22(5):377-382.
[13] Brackmann M, Wang J, Basler M. Type VI secretion system sheath inter-subunit interactions modulate its contraction[J]. EMBO Rep,2018,19(2):225-233.
[14] Salih O, He S, Planamente S, et al. Atomic Structure of Type VI Contractile Sheath from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Structure,2018,26(2):329-336.
[15] Lossi N S, Dajani R, Freemont P, et al. Structure-function analysis of HsiF, a gp25-like component of the type VI secretion system, in Pseudomonas aeruginosa[J]. Microbiology,2011,157(Pt 12):3292-3305.
[16] Pietrosiuk A, Lenherr E D, Falk S, et al. Molecular basis for the unique role of the AAA+ chaperone ClpV in type VI protein secretion[J]. J Biol Chem,2011,286(34):30010-30021.
[17] Corbitt J, Yeo J S, Davis C I, et al. T6SS dynamics reveals a novel secretion mechanism in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Bacteriol,2018,200(11):e000744-17.
[18] Kapitein N, Bonemann G, Pietrosiuk A, et al. ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion[J]. Mol

Microbiol,2013,87(5):1013-1028.
[19] Cianfanelli F R, Monlezun L, Coulthurst S J. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon[J]. Trends Microbiol,2016,24(1):51-62.
[20] Bingle L E, Bailey C M, Pallen M J. Type VI secretion: a beginner's guide[J]. Curr Opin Microbiol,2008,11(1):3-8.
[21] Hood R D, Singh P, Hsu F, et al. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria[J]. Cell Host Microbe,2010,7(1):25-37.
[22] Lu D, Shang G, Yu Q, et al. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of the T6SS effector protein Tse3 from Pseudomonas aeruginosa[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun,2013,69(Pt 5):524-527.
[23] Russell A B, Peterson S B, Mougous J D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose[J]. Nat Rev Microbiol,2014,12(2):137-148.
[24] Whitney J C, Beck C M, Goo Y A, et al. Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system[J]. Mol Microbiol,2014,92(3):529-542.
[25] Whitney J C, Quentin D, Sawai S, et al. An interbacterial NAD(P)(+) glycohydrolase toxin requires elongation factor Tu for delivery to target cells[J]. Cell,2015,163(3):607-619.
[26] Lacourse K D, Peterson S B, Kulasekara H D, et al. Conditional toxicity and synergy drive diversity among antibacterial effectors[J]. Nat Microbiol,2018,3(4):440-446.
[27] Russell A B, Leroux M, Hathazi K, et al. Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors[J]. Nature,2013,496(7446):508-512.
[28] Wilderman P J, Vasil A I, Johnson Z, et al. Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model.[J]. Molecular Microbiology,2001,39(2):291-303.
[29] Jiang F, Waterfield N R, Yang J, et al. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells[J]. Cell Host Microbe,2014,15(5):600-610.
[30] Sana T G, Baumann C, Merdes A, et al. Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network[J]. MBio,2015,6(3):e712.
[31] Kierbel A, Gassama-Diagne A, Rocha C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exploits a PIP3-dependent pathway to transform apical into basolateral membrane[J]. J Cell Biol,2007,177(1):21-27.
[32] Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Protein Cell,2015,6(1):26-41.
[33] Lesic B, Starkey M, He J, et al. Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis[J]. Microbiology,2009,155(Pt 9):2845-2855.
[34] Gallique M, Bouteiller M, Merieau A. The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication?[J]. Front Microbiol,2017,8:1454.
[35] Sana T G, Hachani A, Bucior I, et al. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells[J]. J Biol Chem,2012,287(32):27095-27105.
[36] Kustu S, Santero E, Keener J, et al. Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism[J]. Microbiol Rev,1989,53(3):367-376.
[37] Viducic D, Murakami K, Amoh T, et al. RpoN modulates carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* through *Pseudomonas* quinolone signal and PqsE[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy,2016,60(10):5752-5764.
[38] Zhao C, Yang L, Yicai C, et al. RpoN Regulates Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* via Modulating the PqsR Quorum Sensing Regulator[J]. International Journal of Molecular Sciences,2015,16(12):28311-28319.
[39] Shao X, Zhang X, Zhang Y, et al. RpoN-dependent direct regulation of quorum sensing and the Type VI secretion system in Pseudomonas aeruginosa PAO1[J]. J Bacteriol,2018,in press,doi: 10.1128/JB.00205-18.
[40] Al G, M M, M H, et al. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen.[J]. Genes Dev,2009,23(2):249-259.
[41] Allsopp L P, Wood T E, Howard S A, et al. RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2017:7707-7712.
[42] Brencic A, Mcfarland K A, Mcmanus H R, et al. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs[J]. Molecular Microbiology,2009,73(3):434-445.
[43] Y I, M S, An E, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated

transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA.[J]. Molecular Microbiology,2010,78(1):158-172.
[44] Unterweger D, Kostiuk B, Pukatzki S. Adaptor Proteins of Type VI Secretion System Effectors[J]. Trends Microbiol,2017,25(1):8-10.
[45] Lin J, Cheng J, Chen K, et al. The icmF3 locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Front Cell Infect Microbiol,2015,5:70.
[46] Nguyen V S, Logger L, Spinelli S, et al. Inhibition of type VI secretion by an anti-TssM llama nanobody[J]. PLoS One,2015,10(3):e122187.